

Mycorrhizal Phosphate Transporters of *Petunia hybrida* and Their Impact on Mineral Nutrient Composition

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität zu Köln



vorgelegt von
Martin Olivi
aus Bonn

Köln, 2013

Abstract

Biological processes involving mineral nutrient uptake and metabolism in plants are of complex nature and their molecular principles are still only poorly understood. This work tries to elucidate the impact of mycorrhizal nutrient transfer on the ornamental model plant *Petunia hybrida*, focussing on mycorrhizal phosphate transport facilitated by members of the well characterised *Pht1* gene family of phosphate transporters.

The *Pht1* gene families of *P. hybrida*, *P. inflata* and *P. axillaris* were analysed via PCR-based cloning, sequencing and computational analysis of the respective RNA and DNA. The *Pht1* gene family of *Petunia* was shown to consist of seven distinct members. Comparison of the seven promoter and coding regions revealed a very high sequence homology and a close spacial proximity between *Pht1;4* and *Pht1;5*, which indicates an evolutionary, regulatory and/or functional connection of these genes. The lack of known (phosphate transport related) regulatory elements in the putative promoter region of *Pht1;6* and its high homology to *Pht1;1* leads to the assumption that *Pht1;6* could be pseudogene. Additionally, a biochemical characterisation of the transport properties of five members of the *Pht1* family through heterologous expression in yeast was attempted and did not reveal conclusive results.

Several *Petunia hybrida* *dTph1* transposon insertion mutant libraries (over 13000 plants) were searched for insertions in members of the *Pht1* phosphate transporter gene family. Due to the elevated seed age of the mutant collections, only one single insertion mutant was successfully identified, verified and germinated. A *dTph1* transposon insertion was located at base number 200 in the coding sequence of the *PEThy;Pht1;5* gene, which leads to a premature translation stop in this *pht1;5* mutant.

The backcrossed and stabilised *pht1;5* mutant does not exhibit visible phenotypical differences compared to wildtype plants under mycorrhizal and non mycorrhizal low Pi growth conditions, neither in the greenhouse nor in the field. The expression analysis of five *Pht1*

genes in *pht1;5* and wildtype plants did not reveal significant differences, but the significant repression of *PETHy;Pht1;2* expression in mycorrhizal roots of wildtype plants cannot be observed in the *pht1;5* mutant. Interestingly, the manganese concentrations of *pht1;5* were significantly increased compared to wildtype, while other mineral nutrient concentrations were unchanged. It could also be shown that mycorrhizal *P. hybrida* plants generally show an enhanced accumulation of several essential mineral nutrients such as P, Mg, S, Ca, Co or Zn, however without showing a positive mycorrhizal growth response.

In the second part of this thesis, the mineral nutrient composition of leafy stem cuttings from *Petunia hybrida* was analysed in an eight day time course experiment using ICP-MS. Although, no significant nutrient fluxes during the first eight days of the rooting process could be shown, a modest trend for remobilisation of elements like phosphorus, potassium or sulfur was observed in this study.

This thesis provides new insights into the underlying principles of mycorrhizal phosphate transport in *Petunia hybrida*. Furthermore, a sophisticated analysis of the mineral nutrient contents of mycorrhizal and non-mycorrhizal *Petunia hybrida* plants, as well as of *Petunia hybrida* cuttings during the early events of adventitious root formation, provides a better understanding of the dynamics and differences in nutrient uptake and (re-)mobilisation.

Zusammenfassung

Die biologischen Prozesse während der Aufnahme und des Metabolismus von mineralischen Nährstoffen in Pflanzen sind von komplexer Natur und ihre molekularen Grundlagen nur unzureichend verstanden. In dieser Arbeit wird der Beitrag der Mykorrhiza zur Nährstoffversorgung in der Zierpflanze *Petunia hybrida* untersucht. Dabei wird ein besonderer Schwerpunkt auf den Phosphattransport durch die gut charakterisierte *Pht1* Genfamilie von Phosphattransportern in der Mykorrhiza gelegt.

Die *Pht1* Genfamilien von *P. hybrida*, *P. inflata* und *P. axillaris* wurden mit Hilfe von PCR-basierten Klonierungen, Sequenzierungen und computergestützten Analysen der jeweiligen RNA und DNA untersucht. Es konnte gezeigt werden, daß die *Pht1* Genfamilie von *Petunia* aus sieben Mitgliedern besteht. Ein Vergleich von Promotorregionen und kodierenden Bereichen ließ eine sehr hohe Sequenzhomologie und eine enge räumliche Nähe zwischen *Pht1;4* und *Pht1;5* erkennen, welche eine evolutionäre, regulatorische und/oder funktionelle Verbindung nahe legt. Das Fehlen von bekannten (den Phosphattransport betreffenden) regulatorischen Elementen in der putativen Promotorregion von *Pht1;6* und die große Sequenzhomologie zu *Pht1;1* führt zu der Annahme, dass *Pht1;6* ein Pseudogen sein könnte. Eine ebenfalls durchgeführte biochemische Charakterisierung der Transporteigenschaften von fünf Mitgliedern der *Pht1* Familie durch heterologe Expression in Hefe führte zu keinen zusätzlichen Ergebnissen.

Mehrere Sammlungen von *Petunia hybrida dTph1* Transposon-Insertionsmutanten (über 13000 Pflanzen) wurden nach Transposoninsertionen in Genen der *Pht1* Phosphattransporterfamilie durchsucht. Aufgrund des erhöhten Alters des Saatgutes in den Mutantensammlungen, konnte nur eine einzige Insertionsmutante erfolgreich identifiziert, verifiziert und ausgekeimt werden. An Base Nummer 200 der kodierenden Sequenz des *PEThy;Pht1;5* Genes dieser *pht1;5*-Mutante wurde eine *dTph1* Transposoninsertion identifiziert, welche zu einem vorzeitigen Translationsstopp führt.

Unter niedrigen Phosphatbedingungen zeigt die rückgekreuzte und stabilisierte *pht1;5*-Mutante keine sichtbaren phänotypischen Unterschiede im Vergleich zu *Pht1;5* Pflanzen. Dies ist unabhängig von der Anwesenheit von Mykorrhizapilzen und bleibt sowohl im Gewächshaus als auch während der Freilandversuche unverändert. Eine Expressionsanalyse von fünf *Pht1* Genen in *pht1;5* und *Pht1;5* Pflanzen ergab keine signifikanten Unterschiede. Die signifikante Repression von *PETHy;Pht1;2* in *Pht1;5* Pflanzen konnte jedoch in der *pht1;5* Mutante nicht beobachtet werden. Die Mangankonzentrationen in der *pht1;5* Mutante waren signifikant erhöht im Vergleich zu *Pht1;5* Pflanzen, während die Konzentrationen andere Nährelemente unverändert blieben. Es konnte ebenfalls gezeigt werden, daß mykorrhizierte *P. hybrida* Pflanzen generell essenzielle Mineralstoffe, wie etwa P, Mg, S, Ca, Co oder Zn besser akkumulieren, sich dies jedoch nicht in einer positiven Wachstumsreaktion niederschlägt.

Im zweiten Abschnitt dieser Arbeit wurde die Nährstoffzusammensetzung von *Petunia hybrida* Stecklingen in einem 8 Tage Zeitverlaufsexperiment mittels ICP-MS analysiert. Obwohl keine signifikanten Nährstoffflüsse in den ersten acht Tagen der Bewurzelungsphase nachgewiesen werden konnten, ist dennoch ein leichter Trend im Hinblick auf die Remobilisierung von Elementen wie Phosphor, Kalium oder Schwefel beobachtet worden.

Diese Arbeit liefert neue Einblicke in die Prinzipien, welche dem mykorrhizavermittelten Phosphattransport in *Petunia hybrida* zugrunde liegen. Darüber hinaus ermöglicht die differenzierte Analyse der Nährstoffzusammensetzung von mykorrhizierten und nicht mykorrhizierten *Petunia hybrida* Pflanzen, sowie von Stecklingen während der frühen Bewurzelungsphase, ein besseres Verständnis für die Dynamik und die Unterschiede in der Aufnahme und (Re-)Mobilisierung von Nährstoffen.